製品コード CY211

TaKaRa

Cycleave RT-PCR SARS virus Detection Kit

説明書

v201002

重症急性呼吸器症候群（SARS：Severe Acute Respiratory Syndrome）は 2002 年 11 月から中国広東省に端を発し、香港、台湾、カナダなど世界中のいくつかの国で大きな問題となっている、肺炎に似た症状を引き起こす新たな感染症です。原因となる病原体は世界保健機関（WHO）により新型のコロナウイルスであると決定され、SARS コロナウイルスと名付けられました。
本キットは 1 本鎖 RNA ウイルスである SARS コロナウイルスが持つ RNA ポリメラーゼ遺伝子をリアルタイム PCR 専用の核酸増幅装置 Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System（製品コード SC200N）＊を用いて検出するリアルタイム RT-PCR キットです。

＊：Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System は Cepheid 社の製品です。

PCR（Polymerase Chain Reaction）法は、原理的に DNA を増幅する反応であり、RNA は直接の基質とはなりえませんが、逆転写酵素によって RNA から cDNA を合成することにより、PCR 法を RNA の解析に応用することが可能です。本キットでは逆転写酵素として M-MLV RTase を使用しています。
また、現在 PCR を用いた実験では、主にサーマルサイクラーを用いて PCR 反応後、得られた増幅産物を電気泳動に供することにより結果を解析しています。これに対し、リアルタイム PCR 法ではサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した機器を用いることにより、PCR による増幅産物の生成過程をリアルタイムでモニタリングし、解析することが可能です。
本キットの増幅には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® HS を使用しているので、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングや primer dimer に由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。
蛍光検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は RNA と DNA からなるキメラプローブと RNaseH の組み合わせによる高感度な検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。プローブは RNA 部分を挟んで一方に蛍光物質が、他方にその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブはインタクトな状態ではクエンチングにより強い蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNaseH により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります。（図 1 参照）この蛍光強度を測定することで増幅産物をモニターすることができます。

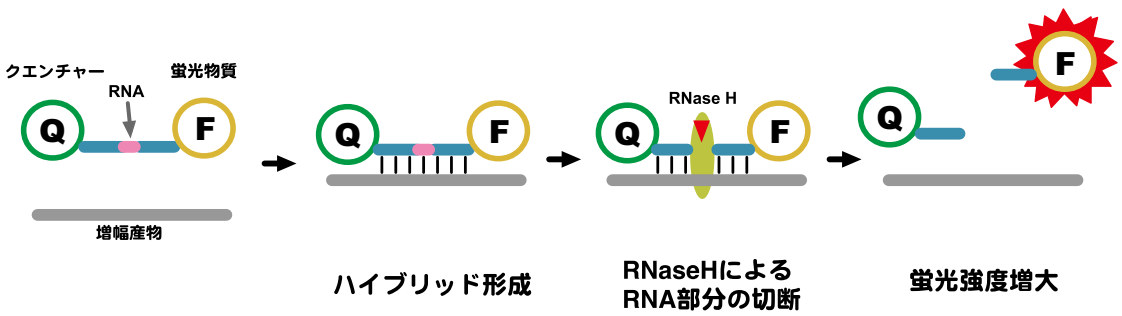


図 1. サイクリングプローブ法の原理

本キットには SARS コロナウイルス検出用 FAM 標識プローブ、ならびにインターナルコントロールとインターナルコントロール検出用 ROX 標識プローブが含まれています。Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System で 2 波長同時にモニタリングすることで、電気泳動が不要となり迅速に結果が得られます。さらにインターナルコントロールによる偽陰性の判定も可能です。また添付の Positive control RNA を用いて検量線を作成することで、ウイルス量の定量も可能です。

I. キットの内容（25 μl 反応× 24 回分）

M-MLV RTase（RNaseH −）＊1	200 U/μl	10 μl
M-MLV RTase Dilution Buffer		100 μl
4 × RT Reaction Mix ＊2	× 4 conc.	100 μl
SARS Reverse primer	2.5 μM	15 μl
SARS Internal control RNA	10^3 copies/μl	30 μl
SARS Positive control RNA	10^5 copies/μl	15 μl
RNA Dilution Buffer		700 μl
TaKaRa Ex Taq® R-PCR	5 U/μl	10 μl
Tli RNaseHII ＊3	200 U/μl	15 μl
5 × PCR Reaction Mix ＊2	× 5 conc.	150 μl
SARS Primer Mix	10 μM each	30 μl
SARS Probe Mix ＊4	× 12.5 conc.	60 μl
RNase Free dH_2O		500 μl

＊1：M-MLV RTase Dilution Buffer で 25 U/μl に希釈して使用（用時調製）
＊2：至適化された反応 Buffer と dNTP mixture を含む
＊3：Thermococcus litoralis 由来の耐熱性 RNaseH
＊4：蛍光標識 probe は遮光保存に留意すること

II. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

【試薬】
1. 滅菌蒸留水
2. RNA 抽出・精製用試薬
   QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）など

【機器】
1. リアルタイム PCR 用増幅装置
   Smart Cycler® System
   Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）
2. Smart Cycler® 専用反応チューブ（製品コード SC910A/C）
3. 卓上型遠心機
4. Smart Cycler® 専用反応チューブ用遠心機
5. サーマルサイクラー（ヒートブロック）または Water Bath（50℃まで温度をあげられるもの）

【器具その他】
1. 200 μl、20 μl、10 μl 各マイクロピペット
2. マイクロピペット用チップ（疎水性フィルターつき）
3. 0.2 ml または 0.5 ml マイクロチューブ
4. ディスポーザブルグローブ

III. 保存

− 20℃（輸送、保存とも）

IV. 操作上の注意

1. 万一キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作中は細心の注意をはらってください。
2. RT-PCR 反応は非常に感度の高い反応です。コンタミネーションを防止するために、反応液調製から検出まで次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   ○ エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○ エリア 2：検体の調製を行います。
   ○ エリア 3：検体の反応液への添加と反応、および検出を行います。

本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動により確認する必要はありません。またコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

V. RNA サンプルの調製（エリア 2 で実施）

市販の RNA 抽出・精製用試薬［例えば QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）など］を使用し、試薬添付のマニュアルに従って、採取した検体からサンプルとなる RNA を調製してください。最終的に滅菌蒸留水溶液または TE Buffer 溶液となるようにしてください。

本キットは RNA から cDNA を合成し、それを鋳型としてリアルタイム PCR による増幅および検出を行うキットです。リアルタイム PCR の前段階となる cDNA 合成を成功させるためには純度の高い RNA サンプルを得ることが大切です。そのためには検体内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理の（1）あるいは（2）を行ってから使用してください。

（1） 乾熱滅菌（180℃、60 分）
（2） 0.1% ジエチルピロカーボネート（DEPC）溶液で 37℃、12 時間処理する。
その後、残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理（120℃、30 分）する。
RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

【溶液】

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる蒸留水はあらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 専用としてお使いください。

VI. RT（逆転写）反応

反応系にコンタミネーションがないことを確認するため、検体のかわりに滅菌蒸留水を加えた Negative control 反応を同時に行ってください。また、キット添付の SARS Positive control RNA を用いた Positive control 反応をあわせて行うことで、以降の反応および検出が正常に行われていることが確認できるとともに、検量線を作成してウイルス量を定量的に測定することができます。

【エリア 1 で実施】

1. M-MLV RTase（200 U/μl）を M-MLV RTase Dilution Buffer で 25 U/μl に希釈する（用時調製：8 倍希釈）。
   検量線を作成する場合は SARS Positive control RNA を RNA Dilution Buffer で段階希釈し、10, 10^2, 10^3, 10^4 copies/μl に調製したものを準備する。

2. 0.2 ml または 0.5 ml マイクロチューブに以下の反応液を氷上で調製する。
   （Sample RNA 以外の試薬で Master Mix を調製すると、ピペッティングによるロスや試薬の分注・撹拌回数が少なくなり、正確な分注を行うことができる。）

   ＜ 1 反応あたり＞

4 × RT Reaction Mix	3 μl	
SARS Reverse primer	0.5 μl	
M-MLV RTase（25 U/μl）	0.5 μl	
SARS Internal control RNA	1 μl	
Sample RNA	1 ～ 7 μl	（←エリア 3 で添加）
RNase Free dH_2O	適宜＊	
Total	12 μl	

   ＊：サンプル溶液は 1 ～ 7 μl の範囲で添加することができる。（サンプル溶液の添加はエリア 3 で行う。）最終反応液量が 12 μl になるように RNase Free dH_2O を加える。

   Negative control としてサンプルのかわりに滅菌蒸留水を加えたものを 1 本調製する。Poitive control 反応は、SARS Positive control RNA を 1 μl 添加する。検量線を作成する場合は 1 で調製した Positive control RNA の段階希釈液および Positive control RNA 原液をそれぞれ 1 μl 添加する。

【エリア 3 で実施】

3. 50℃にセットしたサーマルサイクラー（ヒートブロック）または Water Bath で 10 分間反応させる。

VII. PCR 反応

VII-A. PCR 反応液の調製

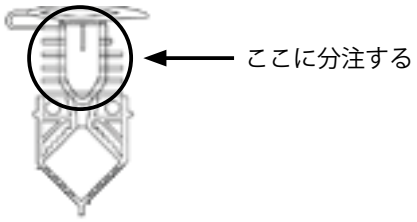
【エリア 1 で実施】

1. 以下の反応液を、必要量をまとめて氷上で調製する。

＜1 反応あたり＞

5 × PCR Reaction Mix	5 μl
SARS Primer Mix	1 μl
SARS Probe Mix	2 μl
TaKaRa Ex Taq® R-PCR	0.25 μl
Tli RNaseHII	0.5 μl
dH_2O	6.25 μl
Total	15 μl

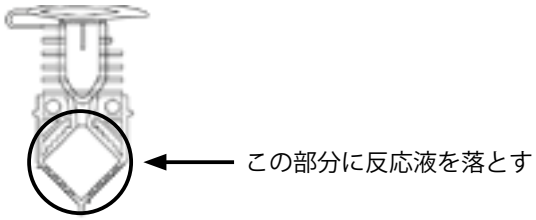
2. 1 の反応液を Smart Cycler® 専用反応チューブの矢印の部分に分注する。



【エリア 3 で実施】

3. VI の RT 反応後の cDNA 溶液を 10 μl 添加し、しっかりと蓋をする。

4. Smart Cycler® 専用反応チューブ用遠心機で遠心を行い、チューブ下部のひし形部分に反応液を落とす。



以降の操作手順については Smart Cycler® System と Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）で若干異なります。それぞれお持ちの System のバージョンを確認したのち、以降の説明に従って操作を行ってください。

Smart Cycler® System　　7 ～ 14 ページ参照
Smart Cycler® II System　　15 ～ 22 ページ参照

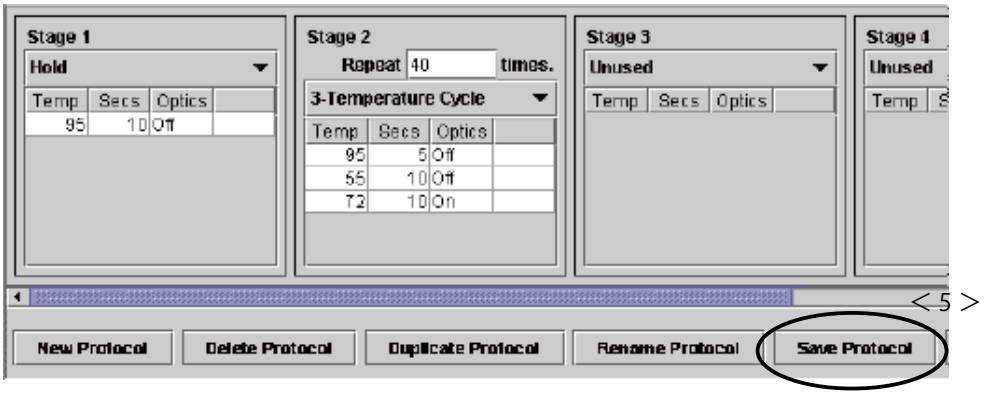
● **Smart Cycler® System の場合**

VII-B. PCR 反応、検出（エリア 3 で実施）

1. Smart Cycler® のセッティング
   Smart Cycler® の取扱いについての詳細は、Smart Cycler® に添付の取扱い説明書を参照してください。

（1）Smart Cycler® を起動する。
（2）Protocol の設定
"Define Protocols" のアイコンをクリックし、"New Protocol" ボタンをクリックして作成するプロトコールの名前を入力後、以下の設定でプロトコールを作成し、"Save Protocol" ボタンで保存する。作成したプロトコールは保存されるので、2 回目以降の反応では入力は不要である。

＜1＞

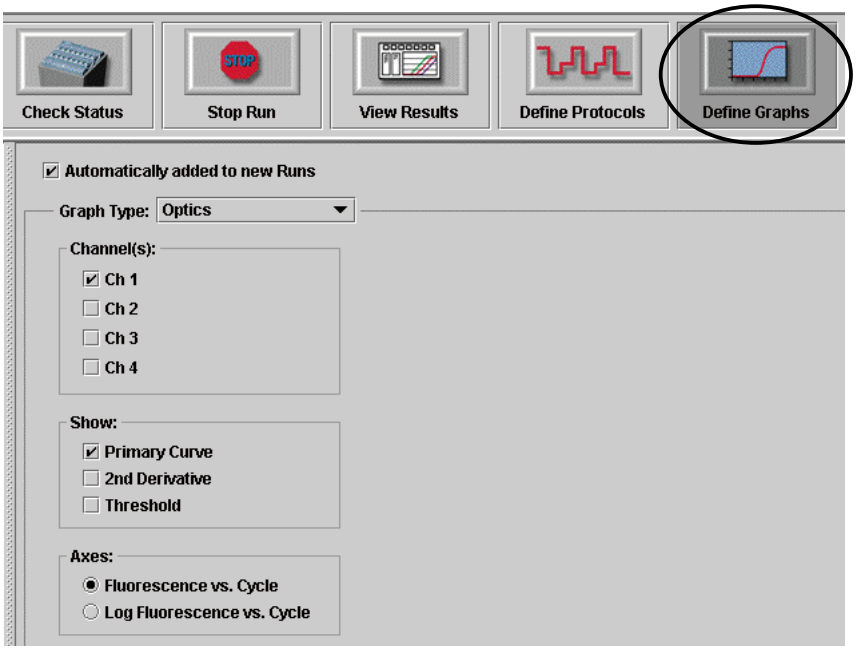


（3）Graph の設定

作成したGraphは保存されるので、2回目以降の反応では入力は不要である。

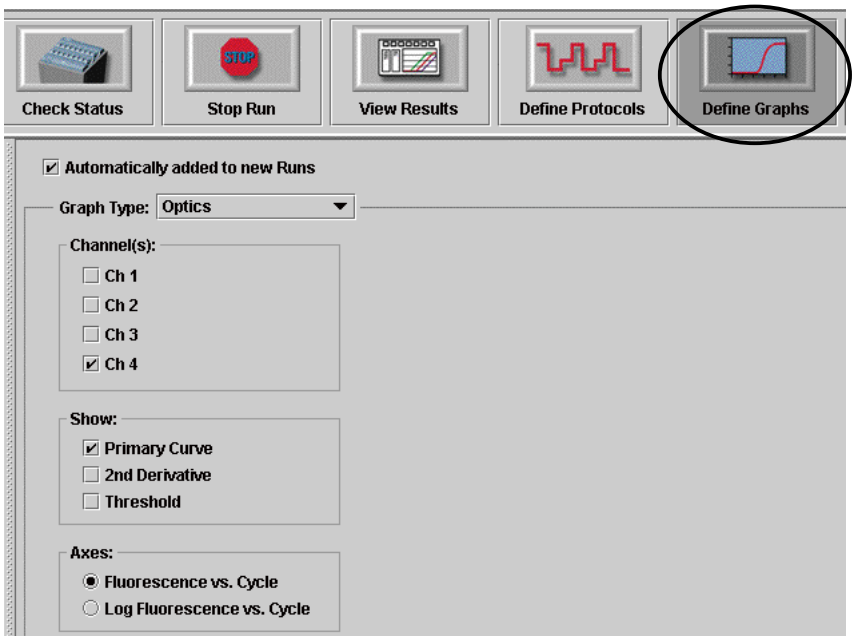
（3）-1. SARS コロナウイルス検出用シグナル曲線（FAM）の設定

“Define Graphs”のアイコンをクリックし、以下の設定でグラフを作成する。（初期設定では FAM というグラフ名で設定済みなので、改めて作成する必要はない。）



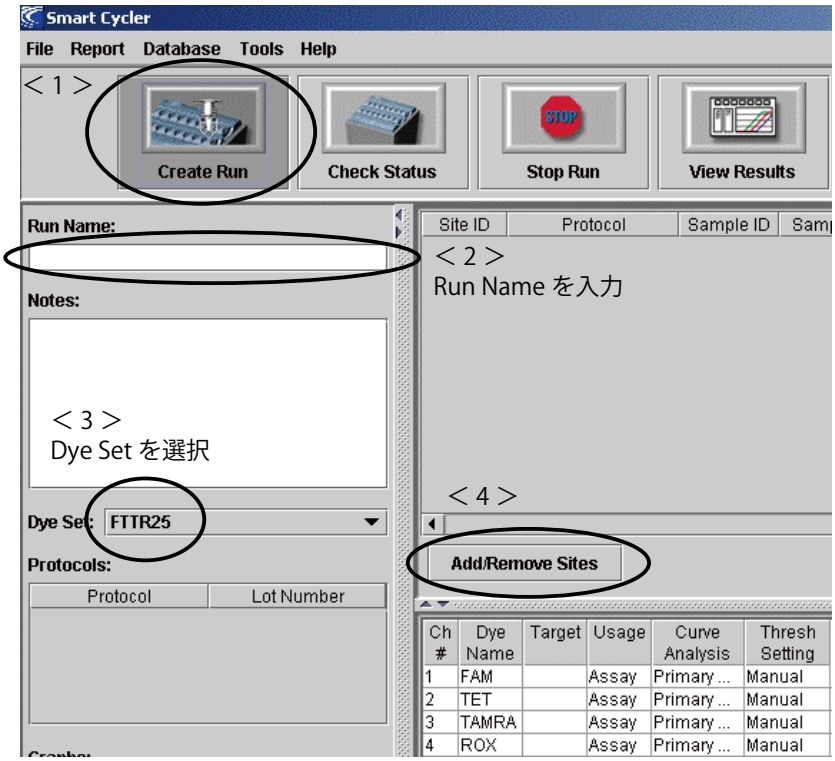
（3）-2. Internal control RNA 検出用シグナル曲線（ROX）の設定

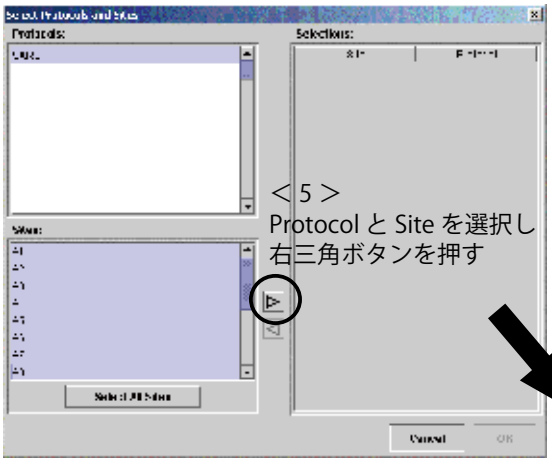
“Define Graphs”のアイコンをクリックし、以下の設定でグラフを作成する。（初期設定では ROX というグラフ名で設定済みなので、改めて作成する必要はない。）

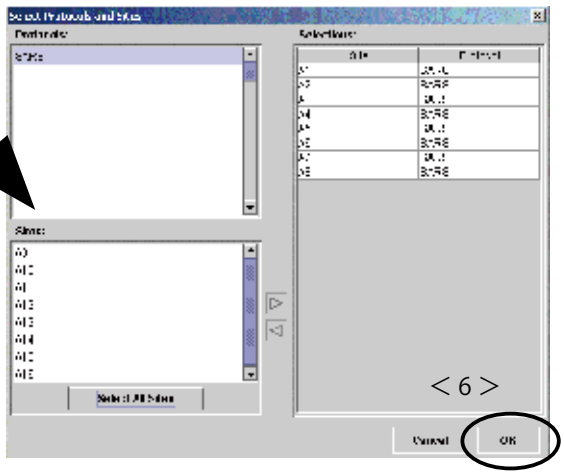


（4）反応の設定

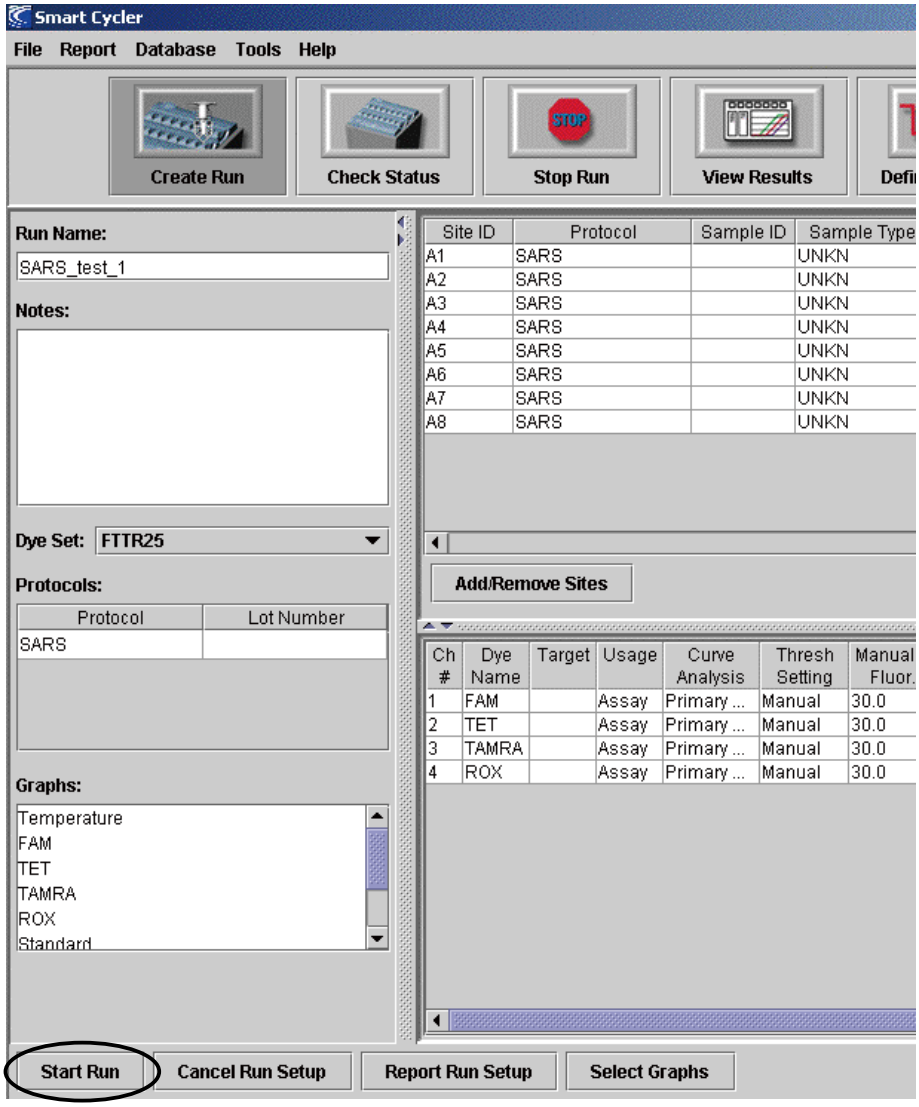
“Create Run” のアイコンをクリックし、Run Name を入力、Dye Set を選択（FTTR25）する。“Add/Remove Sites” ボタンをクリックして Select Protocols and Sites スクリーンを表示させ、使用する Protocol と Site を選択し、“OK” ボタンを押す。







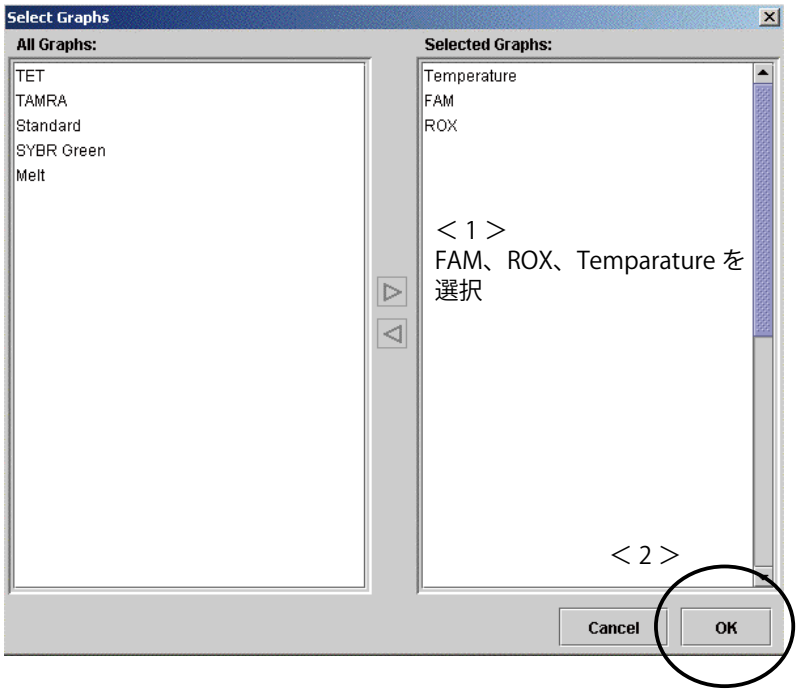
（5）反応チューブを Smart Cycler® にセットし、“Start Run” をクリックして反応を開始する。



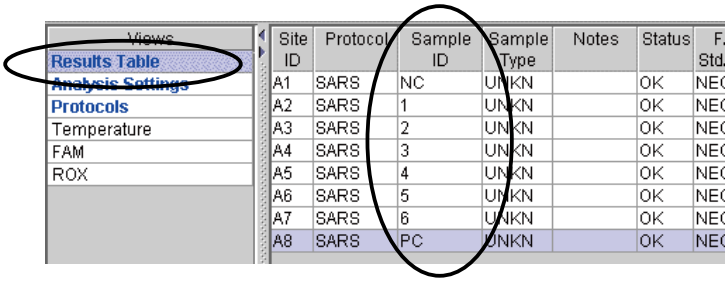
2. 結果表示

（1）“View Results” 画面を表示する。（反応をスタートさせると自動的に “View Results” 画面が表示される。別の画面が表示されている場合は、“View Results” アイコンをクリックする。）

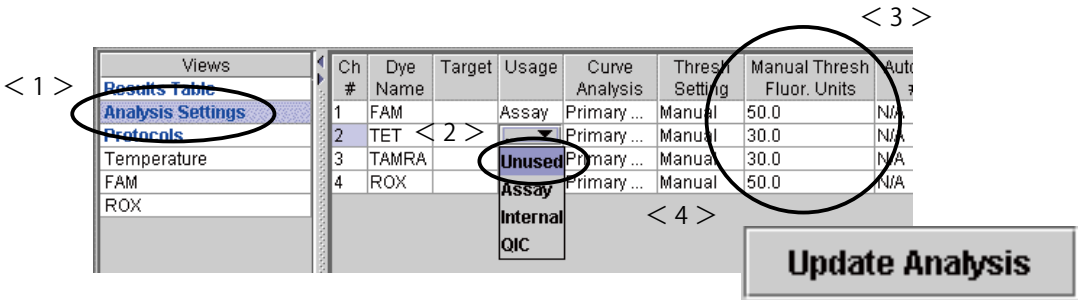
(2) “Select Graphs” ボタンをクリックし、Select Graphs スクリーンを表示して FAM（SARS コロナウイルス検出用）と ROX（Internal control 検出用）および Temperature（温度チャート表示グラフ）を選択する。



(3) Views リストの “Results Table” をクリックして表示し、Sample ID を入力する。

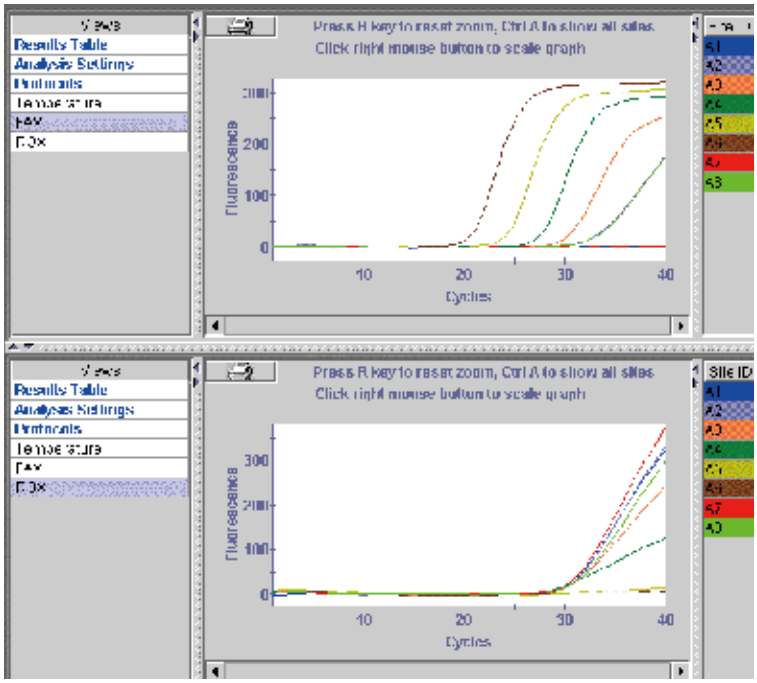


(4) “Analysis Settings” をクリックして表示させ、Ch#2 および Ch#3 の “Usage” をクリックして、プルダウンメニューより “Unused” を選択する。（この設定が有効となった後は Results Table で使用しない Ch のデータは非表示になる。）次に Ch#1 および Ch#4 の “Manual Thresh Flour.Units” を 50 に設定する。これが cut off 値となる。（セルに数値を入力後、画面の “Update Analysis” のボタンをクリックすることで設定が有効になる。）



(5) 上部の Views で “FAM” を選択し、SARS コロナウイルスの検出シグナルの増幅曲線をリアルタイムでモニタリングする。(反応開始後しばらくしてからグラフが描かれる。)

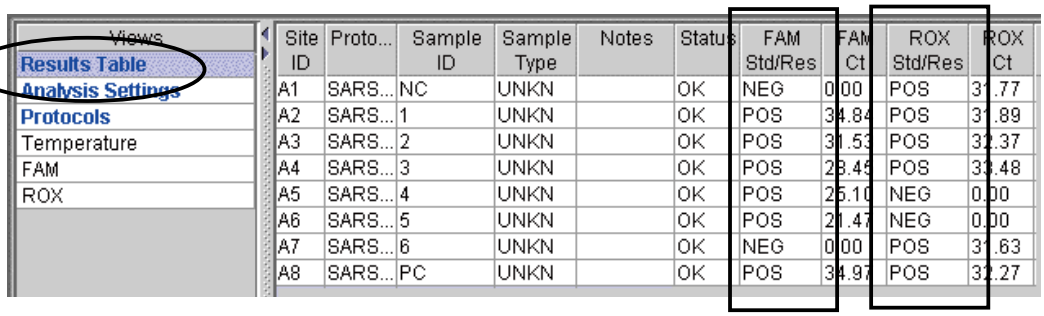
(6) 下部の Views で “ROX” を選択し、Internal control の検出シグナルの増幅曲線をリアルタイムでモニタリングする。(反応開始後しばらくしてからグラフが描かれる。)



FAM シグナル (SARS コロナウイルス検出シグナル) の増幅

ROX シグナル (Internal control 検出シグナル) の増幅曲線

(7) 反応終了後、“Results Table” をクリックして表示し、FAM Std/Res (Standard/Results) および ROX Std/Res (Standard/Results) の列を見て検出結果を確認する。蛍光シグナル値が 50 以上の場合は POS と表示され、50 未満の場合は NEG と表示される。



VII. 判定

40 サイクルのリアルタイム PCR において、ROX の検出蛍光シグナル値が 50 以上を示した場合、“Results Table” の ROX Std/Res（Internal control 検出用プローブ由来の蛍光シグナルの検出結果）に POS と表示され、50 未満の場合 NEG と表示される。また、FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出用プローブ由来の蛍光シグナルの検出結果）にも同様に表示される。
これらの結果表示より、下記の判定結果表を参照して判定を行う。

判定結果表 1：サンプルを添加した場合（各 control 反応の結果とあわせて最終判定を行うこと）

		FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出）	
		POS	NEG
ROX Std/Res（Internal control 検出）	POS	SARS 陽性＊1	SARS 検出限界以下＊2
	NEG	SARS 陽性＊1	判定不能＊3

判定結果表 2：Positive control 反応の場合（添付の SARS Positive control RNA を使用）

		FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出）	
		POS	NEG
ROX Std/Res（Internal control 検出）	POS	SARS 検出系に問題なし＊4	SARS 検出系に問題あり＊4
	NEG	SARS 検出系に問題なし＊4	判定不能 *3

判定結果表 3：Negative control 反応の場合

		FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出）	
		POS	NEG
ROX Std/Res（Internal control 検出）	POS	コンタミネーションの疑い＊5	コンタミネーションはない
	NEG	コンタミネーションの疑い＊5	判定不能＊3

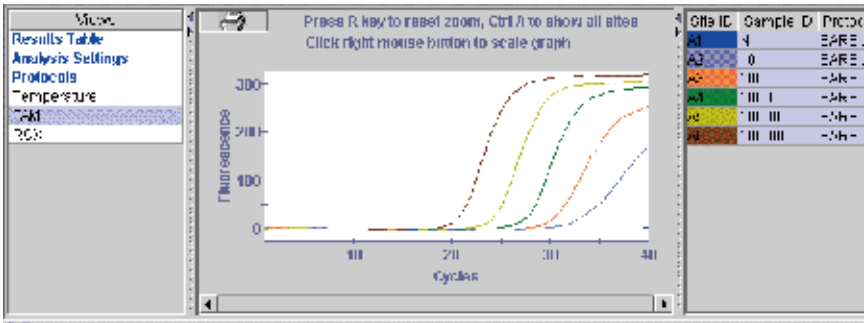
＊1：Negative control の反応で、反応系にコンタミネーションがないことを確認すること。
＊2：Positive control の反応で、SARS 検出系に問題がないことを確認すること。
＊3：何らかの原因で RT 反応、PCR 反応、またはサイクリングプローブ法による検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプルに反応阻害物質が含まれている可能性もある。（トラブルシューティング参照）
＊4：キット添付の SARS Positive control RNA を用いた場合、以下のような結果となる。

Positive control RNA（copies/ 系）	FAM Std/Res	ROX Std/Res
10 ～ 10^3	POS	POS
10^4	POS	POS/NEG
10^5（原液）	POS	NEG

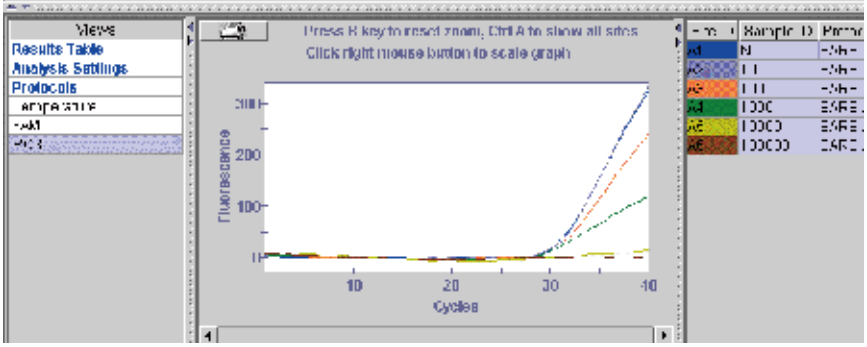
FAM Std/Res が NEG、ROX Std/Res が POS の場合、Probe あるいは SARS Positive control RNA が分解している可能性がある。
＊5：コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

●反応例

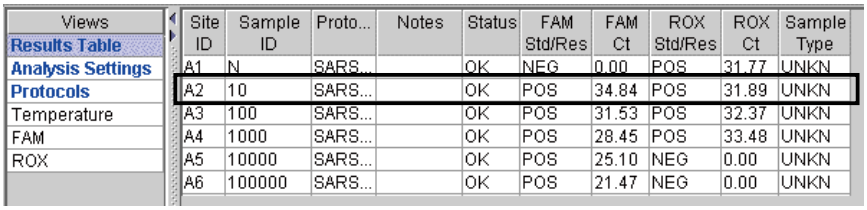
キット添付の SARS Positive control RNA を段階希釈し 10 ～ 10^5 copies/μl となるよう調製したもの各 1 μl を鋳型として、プロトコールに従い反応を行った。



FAM シグナル（SARS コロナウイルス検出シグナル）の増幅曲線



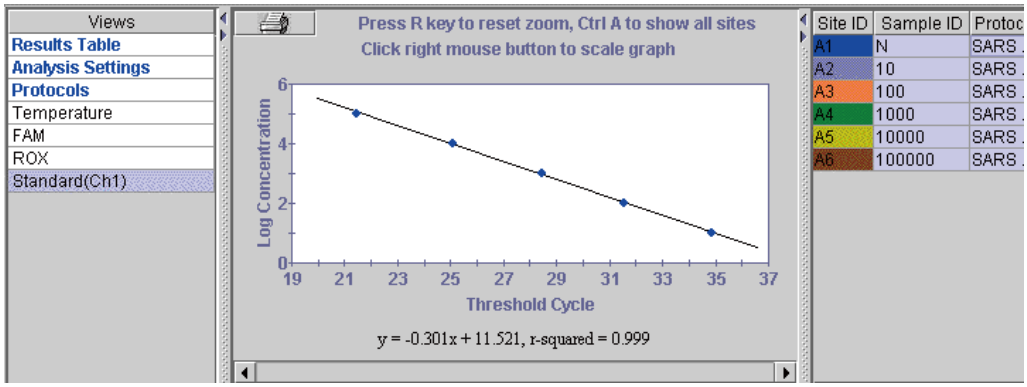
ROX シグナル（Internal control 検出シグナル）の増幅曲線



Site ID	Sample ID	Proto...	Notes	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	ROX Std/Res	ROX Ct	Sample Type
A1	N	SARS...		OK	NEG	0.00	POS	31.77	UNKN
A2	10	SARS...		OK	POS	34.84	POS	31.89	UNKN
A3	100	SARS...		OK	POS	31.53	POS	32.37	UNKN
A4	1000	SARS...		OK	POS	28.45	POS	33.48	UNKN
A5	10000	SARS...		OK	POS	25.10	NEG	0.00	UNKN
A6	100000	SARS...		OK	POS	21.47	NEG	0.00	UNKN

Positive control RNA 10 copies で検出可

この結果から得られた検量線（検量線の作成方法など詳細については Smart Cycler® に添付の取扱説明書を参照してください。）

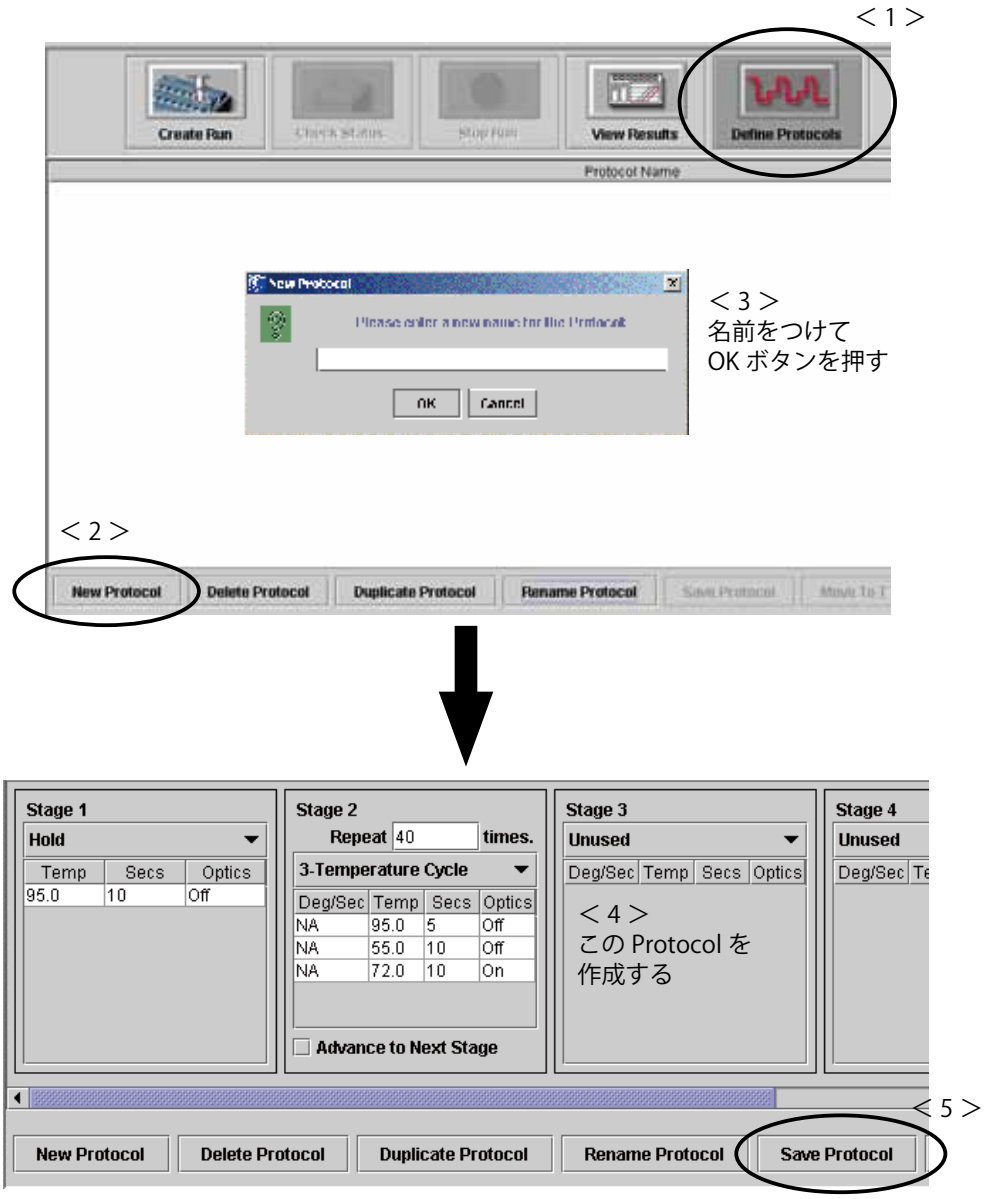


● **Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）の場合**

VII-B. PCR 反応、検出（エリア 3 で実施）

1. Smart Cycler® II のセッティング
   Smart Cycler® II の取扱いについての詳細は、Smart Cycler® II に添付の取扱い説明書を参照してください。

（1）Smart Cycler® II を起動する。
（2）Protocol の設定
"Define Protocols" のアイコンをクリックし、"New Protocol" ボタンをクリックして作成するプロトコールの名前を入力後、以下の設定でプロトコールを作成し、"Save Protocol" ボタンで保存する。作成したプロトコールは保存されるので、2 回目以降の反応では入力は不要である。

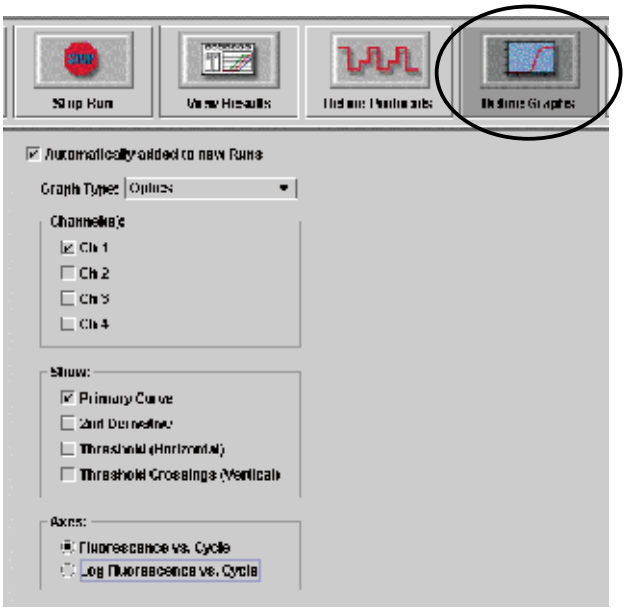


（3）Graph の設定

作成したGraphは保存されるので、2回目以降の反応では入力は不要である。

（3）-1．SARS コロナウイルス検出用シグナル曲線（FAM）の設定

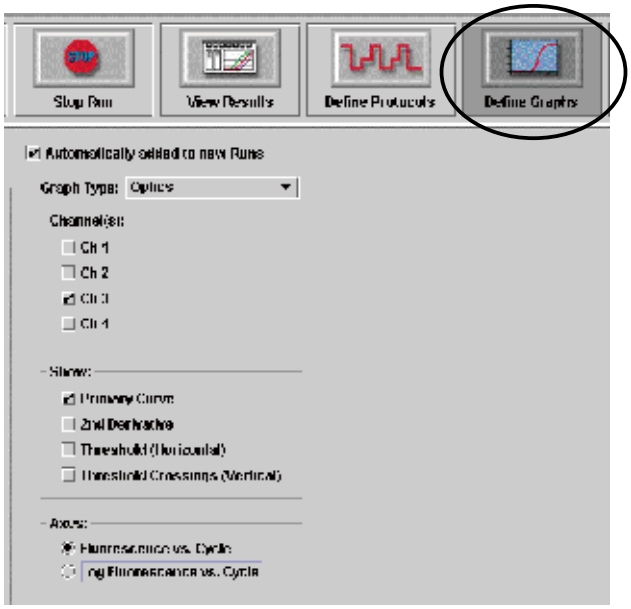
“Define Graphs” のアイコンをクリックし、以下の設定でグラフを作成する。（初期設定では FAM というグラフ名で設定済みなので、改めて作成する必要はない。）



（3）-2．Internal control 検出用シグナル曲線（Texas Red）の設定

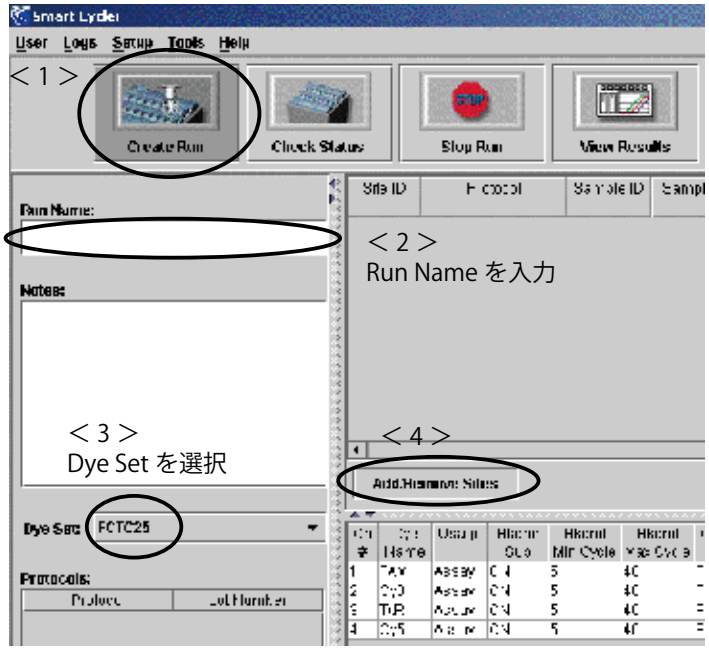
ROX は Texas Red と同じ channel（Ch3）で解析する。

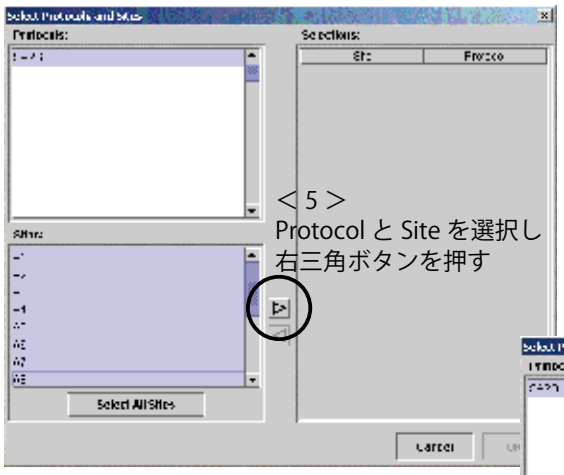
“Define Graphs” のアイコンをクリックし、以下の設定でグラフを作成する。（初期設定では Texas Red というグラフ名で設定済みなので、改めて作成する必要はない。）

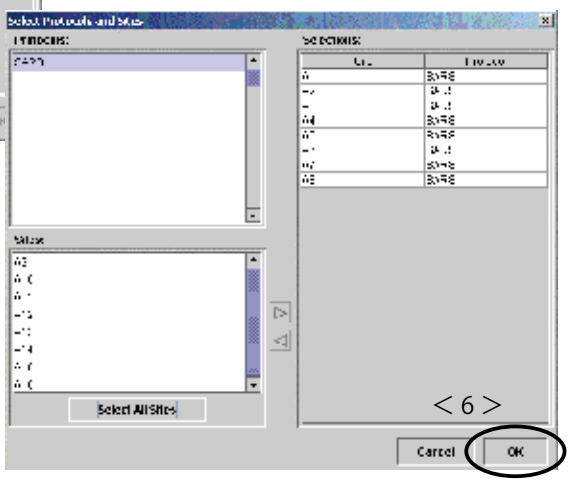


(4) 反応の設定

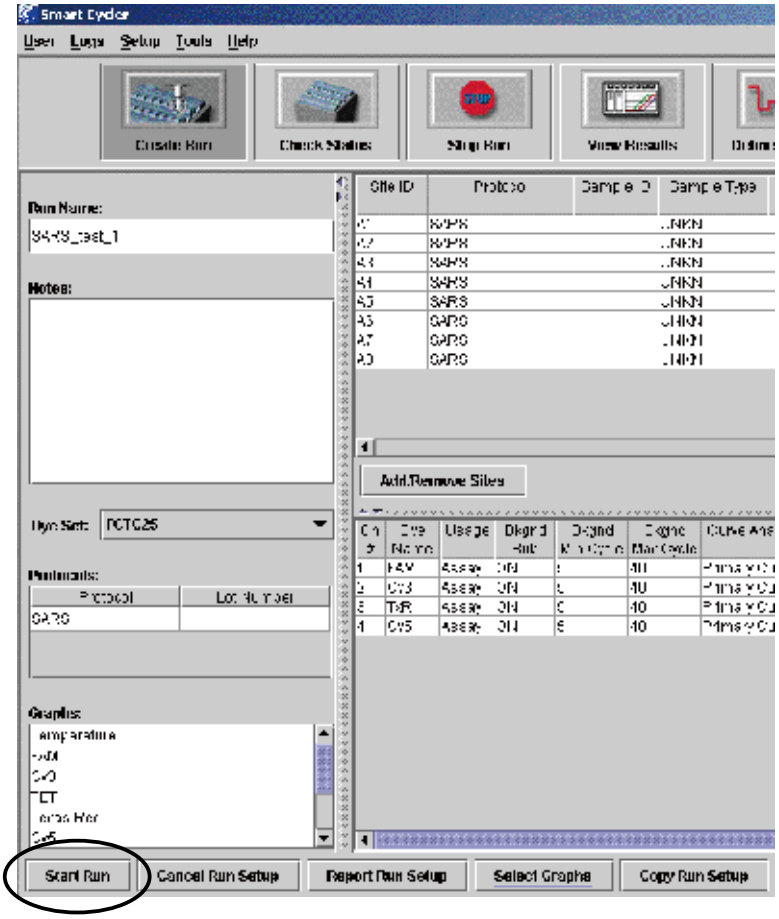
"Create Run" のアイコンをクリックし、Run Name を入力、Dye Set を選択（FCTC25）する。"Add/Remove Sites" ボタンをクリックして Select Protocols and Sites スクリーンを表示させ、使用する Protocol と Site を選択し、"OK" ボタンを押す。





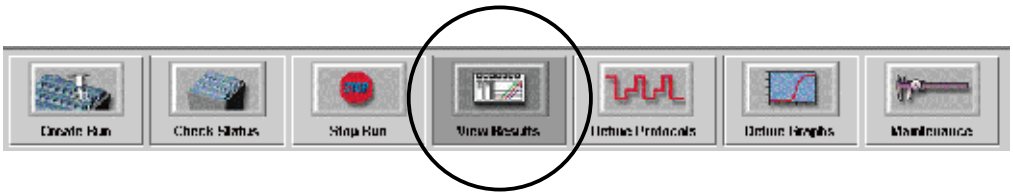


（5）反応チューブを Smart Cycler® II にセットし、“Start Run” をクリックして反応を開始する。

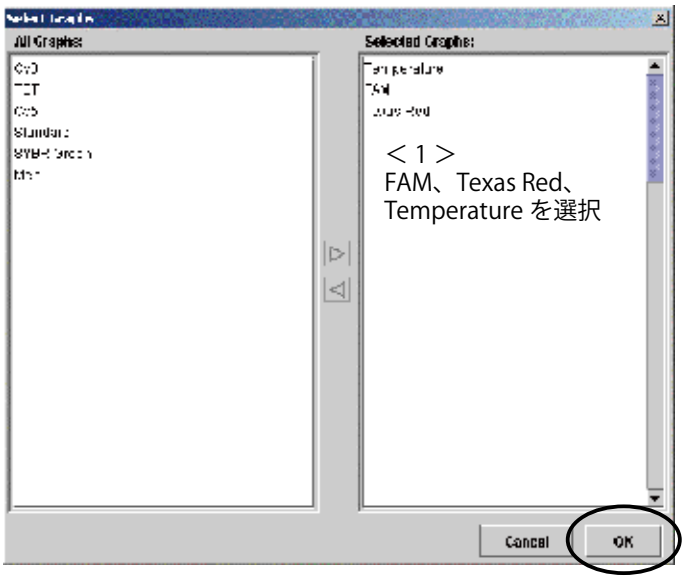


2. 結果表示

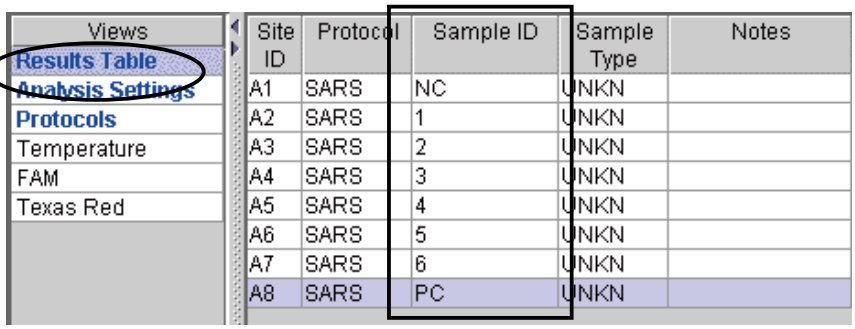
（1）“View Results” 画面を表示する。（反応をスタートさせると自動的に “View Results” 画面が表示される。別の画面が表示されている場合は、“View Results” アイコンをクリックする。）



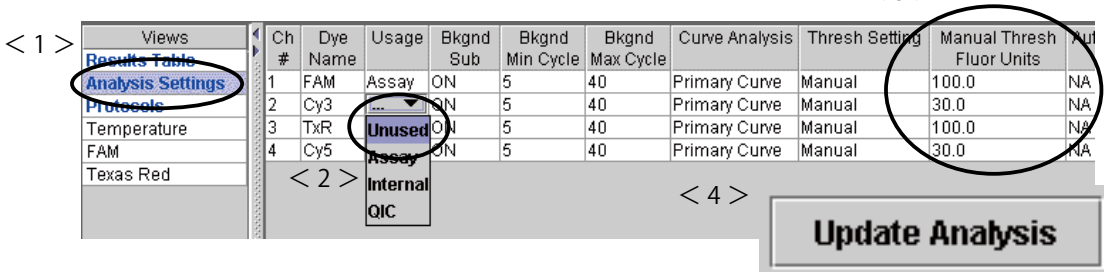
(2) “Select Graphs” ボタンをクリックし、Select Graphs スクリーンを表示して FAM（SARS コロナウイルス検出用）と Texas Red（Internal control 検出用）および Temperature（温度チャート表示グラフ）を選択する。



(3) Views リストの “Results Table” をクリックして表示し、Sample ID を入力する。

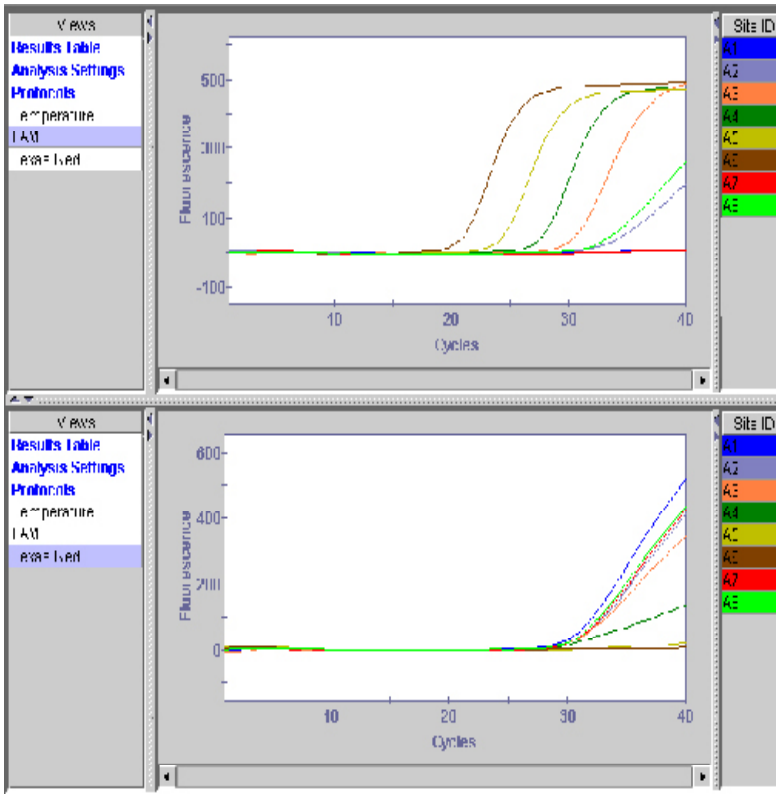


(4) “Analysis Setting s” をクリックして表示させ、Ch#2 および Ch#4 の “Usage” をクリックして、プルダウンメニューより “Unused” を選択する。（この設定が有効となった後は Results Table で使用しない Ch のデータは非表示になる。）次に Ch#1 および Ch#3 の “Manual Thresh Flour.Units” を 100 に設定する。これが cut off 値となる。（セルに数値を入力後、画面の “Update Analysis” のボタンをクリックすることで設定が有効になる。）



(5) 上部の Views で “FAM” を選択し、SARS コロナウイルスの検出シグナルの増幅曲線をリアルタイムでモニタリングする。(反応開始後しばらくしてからグラフが描かれる。)

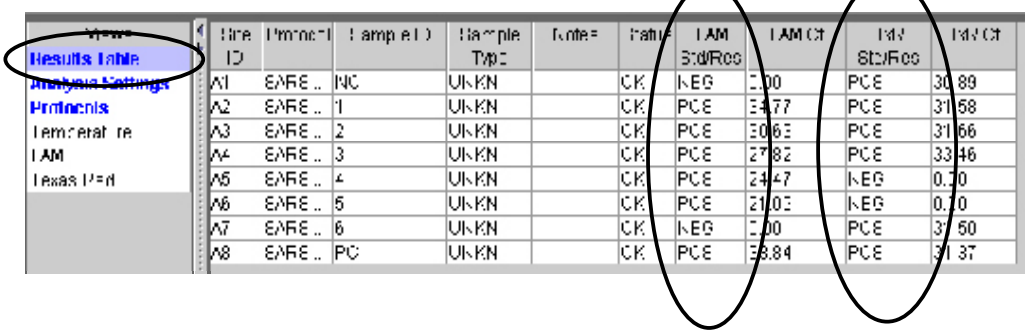
(6) 下部の Views で “Texas Red” を選択し、Internal control の検出シグナルの増幅曲線をリアルタイムでモニタリングする。(反応開始後しばらくしてからグラフが描かれる。)



FAM シグナル (SARS コロナウイルス検出シグナル) の増幅曲線

Texas Red シグナル (Internal control 検出シグナル) の増幅曲線

(7) 反応終了後、“Results Table” をクリックして表示し、FAM Std/Res (Standard/Results) および TxR Std/Res (Standard/Results) の列を見て検出結果を確認する。蛍光シグナル値が 100 以上の場合は POS と表示され、100 未満の場合は NEG と表示される。


Views
Results Table
Analysis Settings
Protocols
Temperature
FAM
Texas Red
Tube ID
Protocol
Sample ID
Sample Type
Notes
Status
FAM Std/Res
FAM Ct
TxR Std/Res
TxR Ct
A1 EARE.. NC UNKN OK POS NEG 0.00 POS 30.89
A2 EARE.. 1 UNKN OK POS 34.77 POS 31.58
A3 EARE.. 2 UNKN OK POS 30.63 POS 31.66
A4 EARE.. 3 UNKN OK POS 27.82 POS 33.46
A5 EARE.. 4 UNKN OK POS 24.47 NEG 0.00
A6 EARE.. 5 UNKN OK POS 21.03 NEG 0.00
A7 EARE.. 6 UNKN OK NEG 0.00 POS 37.50
A8 EARE.. PC UNKN OK POS 33.84 POS 31.37

VII. 判定

40 サイクルのリアルタイム PCR において、Texas Red の検出蛍光シグナル値が 100 以上を示した場合、“Results Table” の TxR Std/Res（Internal control 検出用プローブ由来の蛍光シグナルの検出結果）に POS と表示され、100 未満の場合 NEG と表示される。また、FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出用プローブ由来の蛍光シグナルの検出結果）にも同様に表示される。
これらの結果表示より、下記の判定結果表を参照して判定を行う。

判定結果表 1：サンプルを添加した場合（各 control 反応の結果とあわせて最終判定を行うこと）

		FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出）	
		POS	NEG
TxR Std/Res（Internal control 検出）	POS	SARS 陽性＊1	SARS 検出限界以下＊2
	NEG	SARS 陽性＊1	判定不能＊3

判定結果表 2：Positive control 反応の場合（添付の SARS Positive control RNA を使用）

		FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出）	
		POS	NEG
TxR Std/Res（Internal control 検出）	POS	SARS 検出系に問題なし＊4	SARS 検出系に問題あり＊4
	NEG	SARS 検出系に問題なし＊4	判定不能＊3

判定結果表 3：Negative control 反応の場合

		FAM Std/Res（SARS コロナウイルス検出）	
		POS	NEG
TxR Std/Res（Internal control 検出）	POS	コンタミネーションの疑い＊4	コンタミネーションはない
	NEG	コンタミネーションの疑い＊4	判定不能＊3

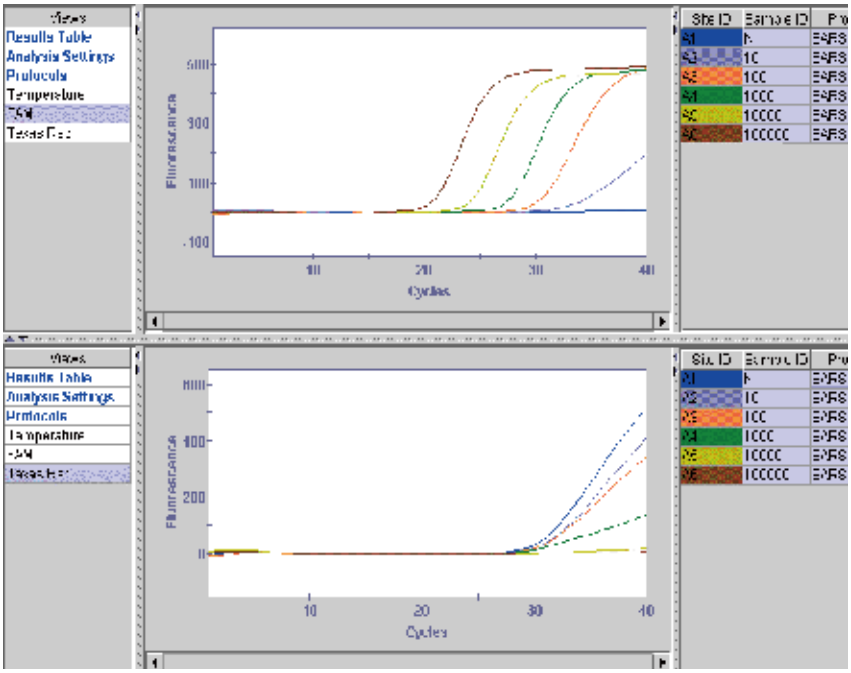
＊1：Negatine controlの反応で、反応系にコンタミネーションがないことを確認すること。
＊2：Positive control の反応で、SARS 検出系に問題がないことを確認すること。
＊3：何らかの原因で RT 反応、PCR 反応、またはサイクリングプローブ法による検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプルに反応阻害物質が含まれている可能性もある。（トラブルシューティング参照）
＊4：キット添付の SARS Positive control RNA を用いた場合、以下のような結果となる。

Positive control RNA（copies/ 系）	FAM Std/Res	ROX Std/Res
10 ～ 10^3	POS	POS
10^4	POS	POS/NEG
10^5（原液）	POS	NEG

FAM Std/Res が NEG、TxR Std/Res が POS の場合、Probe あるいは SARS Positive control RNA が分解している可能性がある。
＊5：コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

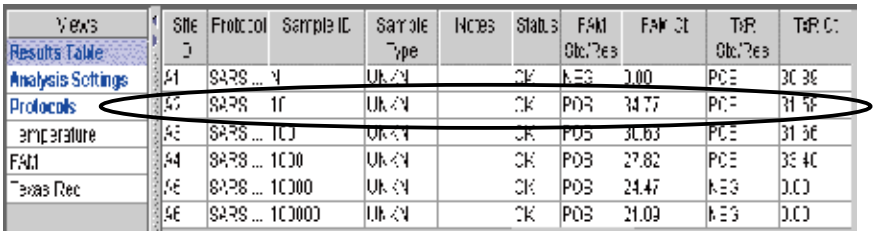
●反応例

キット添付の SARS Positive control RNA を段階希釈し 10 ～ 10^5 copies/μl となるよう調製したもの各 1 μl を鋳型として、プロトコールに従い反応を行った。



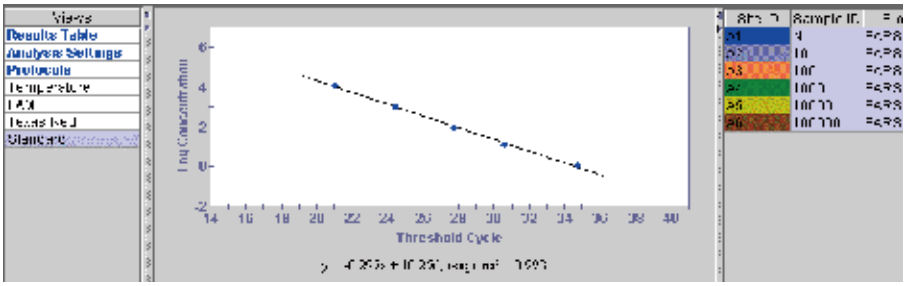
FAM シグナル（SARS コロナウイルス検出シグナル）の増幅曲線

Texas Red シグナル（Internal control 検出シグナル）の増幅曲線



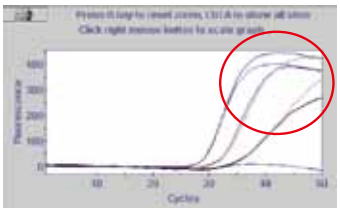
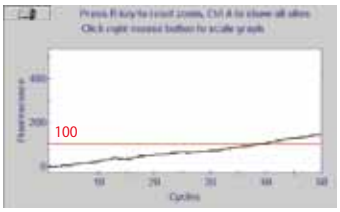
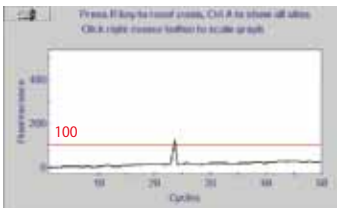
Positive control RNA 10 copies で検出可

この結果から得られた検量線（検量線の作成方法など詳細については Smart Cycler® II に添付の取扱い説明書を参照してください。）



IX. トラブルシューティング

(1) シグナルが全く得られない、シグナルが弱い	・検体のかわりに滅菌蒸留水を用いた Negative control の反応で ROX (Smart Cycler® II の場合は TxR) のシグナルが得られ、Positive control の反応で FAM のシグナルが得られている場合には、反応試薬や設定、操作方法に問題はないと考えられます。 ・検体 RNA の純度を確認して下さい。検体 RNA に反応を阻害する物質が含まれている可能性がありますので、再度調製を行うか、再精製を行って下さい。 ・リアルタイム核酸増幅装置の機器の点検を行って、設定された温度が正しいかどうか確認して下さい。 ・操作方法に間違いがないか説明書をもう一度よく読んで確認してください。 ・検体の反応を行うときに必ず Negative および Positive control を用いた反応を行うことをお勧めします。
(2) すべてのサンプルで FAM, ROX (Smart Cycler® II の場合は FAM、TxR) の両方とも POS になる。	・検体のかわりに滅菌蒸留水を用いた Negative control の反応を行ってみてください。この場合も同じように FAM , ROX (Smart Cycler® II の場合は FAM , TxR) とも POS となる場合は、試薬などに増幅産物などがコンタミネーションしているものと考えられます。本説明書を参照の上、コンタミネーションには最大限の注意を払ってください。 ・チューブ間のクロスコンタミネーションについては、エアロゾルの発生をできる限り防止するように、検体 RNA を含むチューブの開閉などの際は十分注意してください。 ・反応終了後の増幅産物をチューブから取りだすことは避けてください。
(3) FAM あるいは ROX (Smart Cycler® II の場合は TxR) の Std/Res の表示が POS または NEG と表示されずに数値が表示される。	・"Results Table" の Sample Type が "STD" に設定されていると数値表示になります。Sample Type の列はすべて "UNKN" にしてください。 ・キット添付の SARS Positive control RNA を用いて検量線を作成する場合には、Sample Type が "STD" に設定されるため数値表示となります。設定方法など詳細については、Smart Cycler® または Smart Cycler® II に添付の取扱い説明書を参照してください。

(4) 増幅産物以外のシグナルノイズなどにより、過って POS と表示されてしまう。	・増幅曲線を見て判断します。結果が紛らわしい場合は再反応を行ってください。  増幅産物由来の増幅曲線 （シグモイド曲線を描く）   増幅産物以外のシグナル上昇
(5) 蛍光強度シグナルの増幅曲線を表示した時にバックグラウンドが高く見える。	・検出された蛍光強度の変化に微弱なものがあり、そのシグナル値に Y 軸のスケールが自動的に調整されていると思われます。Y 軸のスケールを手動で調整してください。 調整方法は ＜ Smart Cycler® の場合＞ 1. Y 軸の目盛り付近をマウスで右クリックし、“Axes Graph Scale” スクリーンを表示させます。 2. y. Axes（Fl.）の Max に適当な数値（例えば Positive control 反応の Y 軸の値）を入力し、“Apply” ボタンをクリックします。 3. “Exit” ボタンをクリックして “Axes Graph Scale” スクリーンを閉じます。 ＜ Smart Cycler® II の場合＞ 1. Y 軸の目盛り付近をマウスで右クリックしてポップアップメニューより“Scale Graph”を選択し、“Axes Graph Scale”スクリーンを表示させます。 2. y. Axes（Fl.）の Max に適当な数値（例えば Positive control 反応の Y 軸の値）を入力し、“Apply” ボタンをクリックします。 3. “Exit” ボタンをクリックして “Axes Graph Scale” スクリーンを閉じます。 なお、反応中はスケールを変更することはできません。 すべての反応が終了してから行ってください。

X. 参考文献

1）Drosten C., Doerr H. W. *et al*; Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome, *The New England Journal of Medicine 2003*; **348**: 1967-1976
2）Severe acute respiratory syndrome (SARS), *Wkly Epidemiol Rec 2003*; **78**: 81-83
3）Acute respiratory syndrome China, Hong Kong Special Administrative Region of China and Viet Nam, *Wkly Epidemiol Rec 2003*; **78**: 73-74

XI. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・研究目的以外で行った検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。

XII. 関連製品

Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）

ご注意
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. のクエンチャーのライセンスを受け、製造・販売されています。
本製品は、生命科学研究分野、食品検査を含む工業的検査分野、環境分析、法医学や動物診断における検出用です。また、これらの分野において、第三者に検出サービスを提供するために、本製品を商業目的で使用することができます。
ヒトの医療、治療、診断や動物の医療、治療、およびバイオテロに関連する分析、患者の処置あるいは治療方法を選択するための用途には使用できません。
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. 保有の特許（US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830）のライセンスのもと製造・販売されており、本製品と関連技術に関する権利は、上記特許の及ぶ範囲において Epoch Biosciences, Inc. に属します。下記注にある商業用途のライセンスは包含されていませんので、当該商業目的の使用には、Epoch Biosciences, Inc. からの別途ライセンスが必要です。

（注）別途ライセンスが必要な商業用途には以下の用途を含みます。
A: 本製品、あるいは本製品により派生するものを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。
B: 本製品、あるいは本製品により派生するものの使用権につき、第三者にリース・ライセンス・その他の権利付与をおこなうこと。
C: 本製品を含有するキットを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。

ライセンスについてお問い合わせ先：
タカラバイオ株式会社
Tel　077-543-6116　Fax　077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

[L4] Quencher
This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 of U.S. Patent No. 5,436,149 and its foreign counterpart patent claims.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201002